桔小实蝇 V-ATPase G 亚基基因的克隆及组织表达特异性分析

胡黎明，申建梅，宾淑英，林进添*

（仲恺农业工程学院农学院，广州 510225）

摘要：空泡型 ATP 酶（vacuolar-type H^+-ATPase，V-ATPase）作为质子泵几乎在所有的真核生物细胞中发挥重要作用。本研究利用 RT-PCR 和 RACE 技术获得了桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis*（Hendel）V-ATPase G 亚基序列全长，命名为 *BdorATPG*。测序结果表明，*BdorATPG* 阅读框全长 354 bp，编码 117 个氨基酸。氨基酸序列比对表明，BdorATPG 的 N 端序列与其他物种的 ATPG 亚基对应区域具有较高的序列一致性。BdorATPG 与拟暗果蝇 *Drosophila pseudoobscura* ATPG 亚基的氨基酸序列一致性最高，为 88.9%。三维结构模建结果表明，BdorATPG N 端（第 1 ~ 59 位氨基酸）序列为 α-螺旋结构，亲水性和疏水性氨基酸在螺旋两侧呈对称分布。*BdorATPG* 在不同组织中的荧光定量 PCR 分析表明，*BdorATPG* 在各组织中都有表达，其中在触角中的表达量最高；在雄虫生殖节中的表达量是雌虫中的 6.04 倍。结果提示 *BdorATPG* 可能在雄虫生殖生理过程中发挥重要作用。

关键词：桔小实蝇；V-ATPase G 亚基；基因克隆；荧光定量；组织特异性表达

中图分类号：Q966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2011)12-1452-07

Cloning and tissue-specific expression analysis of V-ATPase G subunit gene in *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae)

HU Li-Ming, SHEN Jian-Mei, BIN Shu-Ying, LIN Jin-Tian* (College of Agriculture, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

Abstract: Vacuolar-type H^+-ATPase (V_1V_0-ATPase, V-ATPase), a type of proton pump, functions in almost every eukaryotic cell. In this study, a V-ATPase G subunit gene was cloned from *Bactrocera dorsalis* and named as *BdorATPG*. The open reading frame of *BdorATPG* is 354 bp in length, encoding 117 amino acid residues. Homology analysis showed that BdorATPG has high similarity with corresponding regions of V-ATPase G subunits from other dipteran insects, and shares 88.9% amino acid identity with the V-ATPase G subunit from *Drosophila pseudoobscura*. Three-dimensional structure modeling results showed that the N terminal (1 – 59 amino acids) sequence of *BdorATPG* is α-helix structure, and the hydrophilic and hydrophobic residues are almost symmetrically distributed on both sides of the helix. Real-time PCR analysis revealed that *BdorATPG* mRNA was expressed in all tissues, while the highest expression level was detected in the antenna. The *BdorATPG* mRNA level in male genital segments was about 6.04-fold as high as that in female genital segments, suggesting that V-ATPase plays an especially important role in male reproductive physiological processes.

Key words: *Bactrocera dorsalis*; V-ATPase G subunit; gene cloning; real-time PCR; tissue-specific expression

V 型 ATP 酶（vacuolar H^+-ATPase，V-ATPase）是一种存在于几乎所有真核生物膜结构上的由多个亚基构成的质子泵之一（Stevens and Forgac, 1997）。它能将 ATP 水解所释放的能量转化为生物膜两侧的 H^+ 质子势能。H^+ 质子势能进一步推动细胞内各种生理反应的进行。例如存在于动物溶酶体膜上的 V-ATPase 利用 ATP 水解的能量将胞质中的 H^+（氢离子）泵入溶酶体，在溶酶体内形成适宜的酸性环境从而使溶酶体内的水解酶发挥正常功能（Jones *et al*., 2005）。另外，V-ATPase 作为质子泵还通过调节膜两侧的 H^+ 浓度来平衡膜两侧阳离子如 Na^+，Ca^{2+} 及 Cd^{2+} 的浓度（Dietz *et al*., 2001）。

基金项目：国家自然科学基金项目(30971923)

作者简介：胡黎明，男，1978 年生，博士，讲师，研究方向为昆虫分子生物学，E-mail: hlm66@eyou.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: linjtian@163.com

收稿日期 Received: 2011-09-13；接受日期 Accepted: 2011-11-30

在生物神经信号的传导中，H^+质子依赖型的运载蛋白利用质子势能使神经递质在囊泡内不断积累，从而形成有效的神经信号传导（Parsons，2000；Hediger *et al*.，2004）。可见，昆虫的 V-ATPase 在昆虫的生长、发育、生殖等重要生命活动过程中可能起着非常重要的作用。因此，对昆虫 V-ATPase 的调控将有可能发展成为害虫防治的新方法和新途径。

桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis*（Hendel）属双翅目（Diptera）实蝇科（Tetriphitedae），在东亚地区的热带、亚热带甚至温带地区都有分布，可对 300 余种作物或水果造成不同程度的危害，给当地农业生产造成严重损失（Haramoto and Bess，1970；吕欣等，2007）。由于农药的不合理使用，一些地区的桔小实蝇对有机磷类、拟除虫菊酯类和阿维菌素类农药已经产生了不同程度的抗性（Hsu and Feng，2000；章玉苹等，2007）。本研究采用 PCR 结合 RACE 技术，克隆得到桔小实蝇 V-ATPase G 亚基基因序列，并通过荧光定量技术对 V-ATPase G 基因在桔小实蝇不同组织中的相对表达量进行了分析，为进一步深入研究 V-ATPase 在桔小实蝇生命过程中的作用奠定基础，以期为寻找新的农药作用靶标提供参考依据。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　供试昆虫：桔小实蝇由仲恺农业工程学院昆虫学实验室采用人工饲料饲养（袁盛勇等，2006）。分别收集交配期雌雄虫的触角、头（去除触角）、胸、前足、中足、后足、翅、腹节（去除生殖节）、生殖节等组织样品。取样后置液氮迅速冷却后保存于 -80℃ 冰箱备用。

1.1.2　试剂：RNA 提取试剂盒购于 Omega 公司，3′-RACE 和 5′-RACE 试剂盒购于 Invitrogen 公司，pMD20-T 克隆载体、反转录系统、ExTaq DNA 聚合酶及 SYBR Premix *Ex Taq* 荧光试剂均购于 TaKaRa 公司，核酸琼脂糖凝胶回收试剂盒购于 Tiangen 公司。

1.2　桔小实蝇 RNA 的提取和逆转录

按照 RNA 抽提试剂盒（Omega 公司）使用说明提取桔小实蝇不同组织的总 RNA，每个不同组织取样约 100 ~ 200 mg，并取样 3 次作为重复。经琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测后，按照逆转录系统说明书以 Oligo-dT（引物序列如表 1）为引物进行逆转录获得 cDNA，以此作为 PCR 和荧光定量 PCR 模板。

1.3　引物设计与合成

根据 GenBank 中登录的双翅目昆虫 V-ATPase G 亚基蛋白序列，设计 1 条简并引物 ATPG 与 Oligo-dT 搭配进行桔小实蝇 *ATPaseG* 的 3′-RACE 扩增。根据扩增结果设计两条 5′-RACE 引物（ATPG-51 和 ATPG-52）分别与 GeneRacer 5′ Primer 和 GeneRacer 5′ Nested Primer 搭配进行槽式扩增。再根据序列拼接结果设计了 1 对特异性引物（ATPG ORF1 和 ATPG ORF2）用于扩增桔小实蝇 *ATPaseG* 阅读框区域。所有引物在广州英骏生物技术有限公司合成，引物序列如表 1。

表 1　本研究中所用的引物

Table 1　Primers used in this study

引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5′ - 3′)
Oligo-dT	GGCCGGCCTTTTTTTTTTTT
ATPG	GARTTYGARGCNAAGCAYATGG
ATPG-51	CGTTCACGTTCTTGGCGATATTTCTC
ATPG-52	CTTCGGTGGCCTCATCCTTGGCTTG
Gene Racer 5′ Primer	CGACTGGAGCACGAGGACACTGA
Gene Racer 5′ Nested Primer	GGACACTGACATGGACTGAAGGAGA
ATPG ORF1	ATGACTAGCCAAACGCAAGGT
ATPG ORF2	TTAGTTCTGTACGTAGTTTTTGTG
ATPG QF	CTTAGCCAGGGTGAAGGGATTG
ATPG QR	GTAAAGGCGAAACGGCACCACA
Bact F	CGTTTCCGTTGCCCAGAATTCC
Bact R	TCAGCAATACCTGGGTACATG

1.4　PCR 扩增与 RACE 反应

以合成的 cDNA 为模板，加入 10 × ExTaq DNA 聚合酶反应缓冲液 5 μL（含 Mg^{2+}），正向和反向引物各 1 μL（10 mol/L），2.5 mmol/L dNTP 4 μL，Ex Taq DNA 聚合酶 0.25 μL（5 U/μL），加水至 50 μL，混匀离心后放入 PCR 仪扩增。PCR 反应程序为：94℃ 变性 3 min；接着进行 35 个循环，循环条件为 94℃ 30 s，66℃ 45 s，72℃ 1 min；循环完毕后，72℃ 保温 10 min。RACE 反应参照试剂盒说明书。扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测，回收目的片段。

1.5　PCR 和 RACE 产物克隆及序列测定

PCR 及 RACE 产物经回收纯化后连接到 pMD-20 载体，进一步转化到感受态大肠杆菌 *Escherichia*

coli DH5α 中，经蓝白斑和氨苄筛选，重组质粒经扩大培养，提取质粒 DNA 用于检测。测序工作由广州英骏生物技术有限公司完成。

1.6 序列分析

利用 Blast 在 NCBI 网站进行序列相似性比对分析，采用 Megalign 程序中的 Clustal W 方法进行序列进化关系分析。蛋白三维结构模型采用 Swiss-model 软件。

1.7 荧光定量 PCR

筛选获得符合要求的特异性引物 ATPG QF 和 ATPG QR 用于后续的实时荧光定量 PCR 反应。同时以 *Actin* 基因作为内参基因(引物为 Bact F 和 Bact R)。荧光定量所用引物序列见表 1。

荧光定量 PCR 采用 25 μL 体系，各反应成分的含量为 12.5 μL SYBR 预混液，10 μmol/L 的上、下游引物各 0.5 μL，cDNA 模板 1 μL，灭菌超纯水 10.5 μL，混匀，离心，放入 PCR 仪扩增。PCR 反应条件为：94℃ 预变性 30 s，接着进行 40 个循环，每个循环采用两步法：95℃ 5 s，65℃ 30 s。反应中设置以水为阴性对照，每个组织重复 3 次实验。使用仪器为 Bio-Rad 公司的 iQ5。反应结束后收集 C_T 值。

1.8 数据统计与分析

采用 $2^{-\triangle\triangle C_T}$ 法进行定量分析(Livak and Schmittgen, 2001)，采用 EXCEL 计算各重复平均值与标准差。

2 结果与分析

2.1 桔小实蝇 *ATPG* 基因克隆及序列分析

以桔小实蝇 cDNA 为模板，以简并引物 ATPG 与 Oligo-dT 搭配扩增后通过胶回收后连接到 pMD20-T 载体上并进行测序。将所得序列在 NCBI 核酸库中进行 Blast 分析，结果发现该序列与其他昆虫的 V-ATPase G 亚基基因序列相似性最高，推测所获得的片段是桔小实蝇 V-ATPase G 亚基 cDNA 片段的一部分。根据所得的 cDNA 部分片段设计两条特异引物 ATPG-51 和 ATPG-52 分别与试剂盒中的 5′-RACE 引物搭配进行扩增，测序拼接后得到 *Bdor*ATPG 的 cDNA 全长序列。为验证以上 PCR，3′-RACE 和 5′-RACE 片段是来源于同一个基因，本研究用 1 对特异性引物(ATPG ORF1 和 ATPG ORF2)，扩增得到了一条 354 bp 的特异性条带，测序结果与拼接序列一致。编码区大小为 354 bp，编码 117 个氨基酸，命名为 *BdorATPG*，预测该蛋白分子量约为 13.59 kD，等电点为 9.51。

将 *BdorATPG* 翻译的蛋白序列与来自于脊椎动物门、线虫动物门及节支动物门昆虫纲中的 26 个物种的氨基酸序列进行一致性比对，结果见图 1。根据 Rishikesan 等(2009)报道的结果，在图 1 中用实线框标示了在 G 亚基中可能与亚基 D 结合的区域(第 7 ~ 34 位氨基酸)。根据 Charsky 等(2000)的报道，位于第 15 位的氨基酸(E)、第 47 位的氨基酸(Y)、第 51 位的氨基酸(R)、第 56 位的氨基酸(K)在 V-ATPase 酶分子复合体的稳定性方面发挥作用，本研究在图 1 中用星号进行了标示。磷酸化位点预测表明，位于第 65，89 和 107 位的丝氨酸(S)和第 90 位的苏氨酸(T)是最有可能的磷酸化位点，并在 BdorATPG 序列中用圆圈进行了标示。

由图 1 可见，V-ATPase G 亚基在系列的 N 端序列(第 1 ~ 60 位氨基酸)表现出较高的保守性，而在 C 端的第 71 ~ 104 区域的保守性较差(图中用虚线框标示)。在 PDB 库中同源搜索发现，BdorATPG 亚基第 1 ~ 59 位氨基酸序列与酵母菌的 V-ATPase G 亚基对应区域 2k88 相似性最高,本研究进一步用 SWISS-MODEL 软件以 2k88 为模板进行了 BdorATPG 亚基 N 端三维结构的同源模建，结果如图 2。BdorATPG 亚基模型的 N 端(第 1 ~ 59 位氨基酸)整体呈 α-螺旋结构(图 2：A)，N 端第 1 ~ 9 位氨基酸及第 57 ~ 59 位氨基酸以无规则卷曲形态存在，α-螺旋结构中亲疏水氨基酸用蓝色显示，疏水性氨基酸用黄色显示(图 2：C)。对比图 2(B，C 和 D)发现亲水性和疏水性两组氨基酸大致呈对称状分布于 α-螺旋的左右两侧。

为研究 V-ATPase G 亚基在不同目物种之间的进化关系，本研究从 GeneBank 中选取脊椎动物门、线虫动物门及节肢动物门昆虫纲 26 个物种的 V-ATPase G 亚基序列，采用 Megalin 软件中的 Clustal W 方法构建系统进化树，结果如图 3。

由图 3 可知，V-ATPase G 亚基聚为 3 个大类，分别为节肢动物门、线虫动物门和脊椎动物门。在节肢动物门中，V-ATPase G 亚基的聚类结果与昆虫的分类地位也表现出较高的一致性。BdorATPG 与其他双翅目昆虫如拟暗果蝇 *Drosophila pseudoobscura*、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、刺舌蝇 *Glossina morsitans*、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*、埃及伊蚊 *Aedes aegypti*、致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* 的 V-ATPase G 亚基聚为一类。同属

蚊科的埃及伊蚊 *A. aegypti* 和致倦库蚊 *C. quinquefasciatus* 聚到同一亚类中（二者序列一致性值为88.3%），而冈比亚按蚊与二者表现出相对较远的遗传距离，与二者的序列一致性值分别为69.8%和69.0%。鳞翅目昆虫家蚕 *Bombyx mori* 和烟草天蛾 *Manduca sexta* 的 V-ATPase G 亚基聚到同一亚类中。半翅目、膜翅目、虱目昆虫的 V-ATPase G 亚基表现出相对较近的遗传距离。

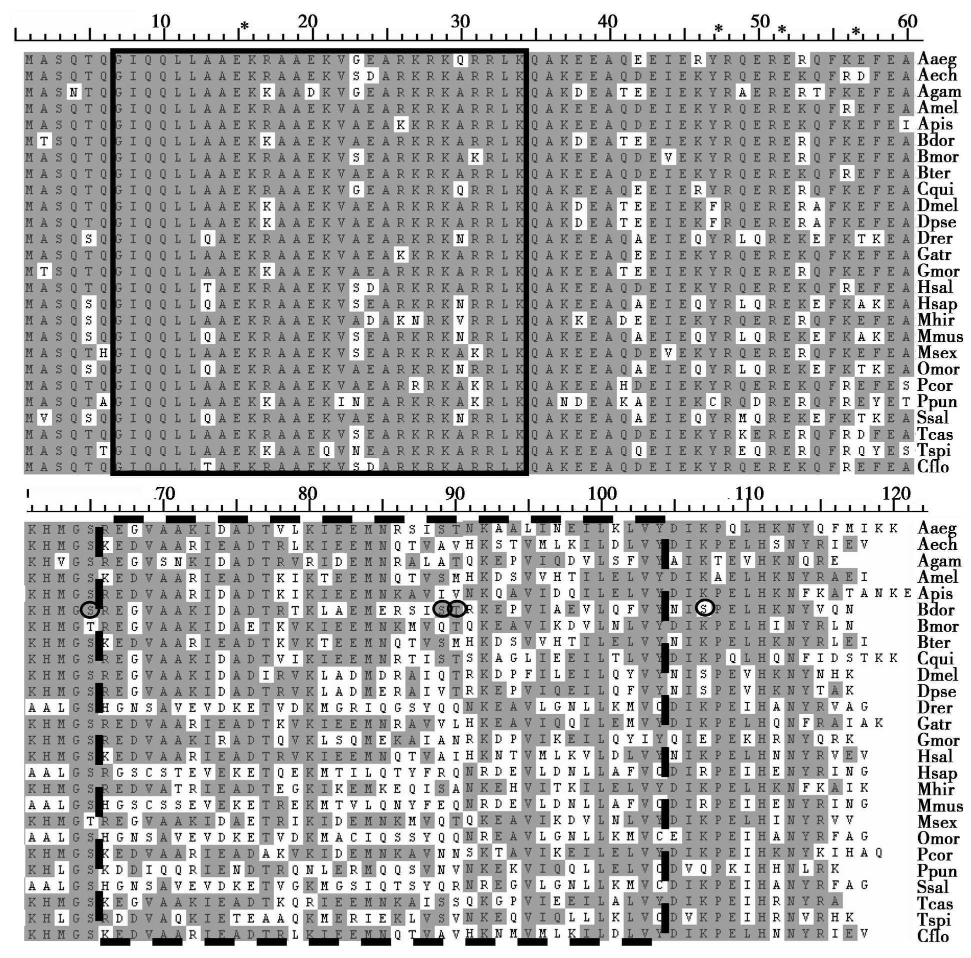


图1　BdorATPG 与其他物种 V-ATPase G 亚基蛋白的氨基酸序列比对

Fig. 1　Amino acid sequence alignment of BdorATPG from *Bactrocera dorsalis* with V-ATPase G subunits from other species

图中实线框标示推测的与 D 亚基结合的区域；虚线框部分表示在蛋白 C 端最不保守的区域；N 端星号表示对 V-ATPase 酶大分子结构稳定起关键作用的氨基酸；圆圈表示在 *BdorATPG* 亚基中可能的磷酸化位点。Solid box reveals the binding region with D subunit. Dashed box shows the least conserved region in the C-terminal of the protein. Circles indicate the phosphorylation sites in the BdorATPG subunit. Dmel：黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*；Dpse：拟暗果蝇 *Drosophila pseudoobscura*；Bdor：桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis*；Gmor：刺舌蝇 *Glossina morsitans*；Agam：冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*；Aaeg：埃及伊蚊 *Aedes aegypti*；Cqui：致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus*；Bmor：家蚕 *Bombyx mori*；Msex：烟草天蛾 *Manduca sexta*；Tcas：赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*；Hsal：印度跳蚁 *Harpegnathos saltator*；Cflo：佛罗里达弓背蚁 *Camponotus floridanus*；Aech：切叶蚁 *Acromyrmex echinatior*；Amel：西方蜜蜂 *Apis mellifera*；Bter：熊蜂王 *Bombus terrestris*；Pcor：人虱 *Pediculus humanus corporis*；Apis：豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum*；Gatr：蓝绿叶蝉 *Graphocephala atropunctata*；Mhir：木槿曼粉蚧 *Maconellicoccus hirsutus*；Ppun：棘壳锯齿线虫 *Prionchulus punctatus*；Tspi：旋毛形线虫 *Trichinella spiralis*；Omor：胡瓜鱼 *Osmerus mordax*；Ssal：大西洋鲑 *Salmo salar*；Drer：斑马鱼 *Danio rerio*；Hsap：人 *Homo sapiens*；Mmus：家鼷鼠 *Mus musculus*.

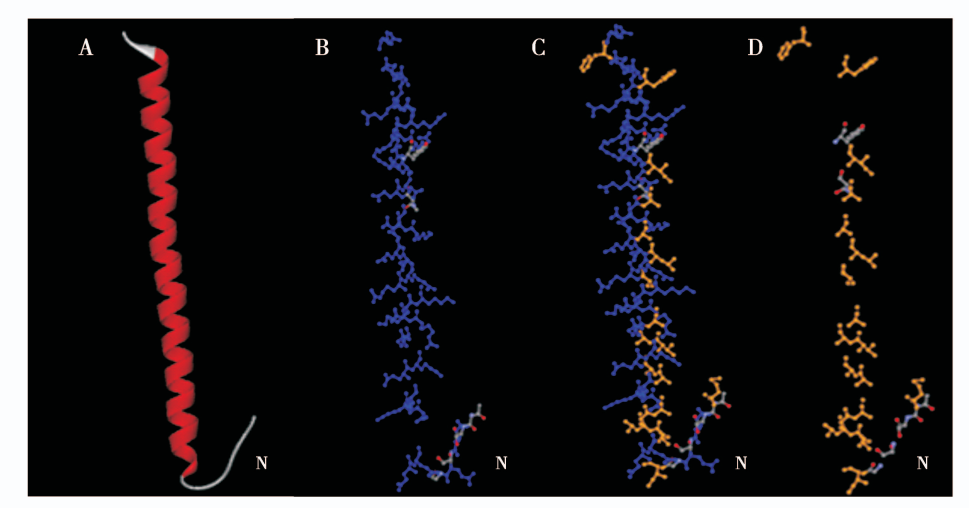


图 2 BdorATPG 亚基 N 端序列的三维结构模型

Fig. 2 The simulated 3D-structure of N-terminal of BdorATPG subunit

A：飘带型三维结构模型 Ribbon diagram；B：亲水性氨基酸 Hydrophilic residues；C：球-棒型三维结构模型 Stick and ball model；D：疏水性氨基酸 Hydrophobic residues.

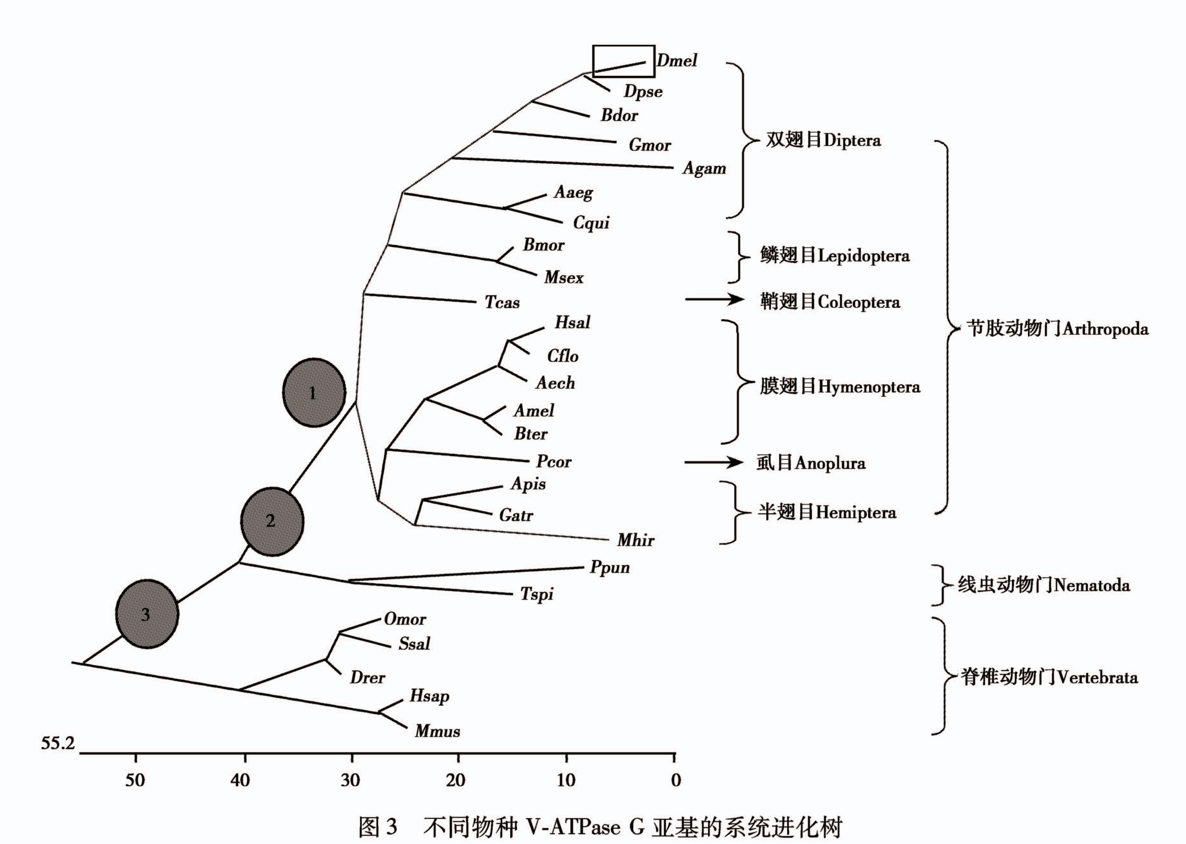


图 3 不同物种 V-ATPase G 亚基的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic relationshipof V-ATPase G subunit protein in different species

图中物种名缩写同图 1。The abbreviations of the species names are the same as in Fig. 1.

氨基酸序列一致性分析表明，BdorATPG 与双翅目昆虫拟暗果蝇 *D. pseudoobscura* 的 V-ATPase G 亚基序列一致性最高，达 88.9%；与黑腹果蝇 *D. melanogaster* 的序列一致性次之，为 84.6%；与脊椎动物大西洋鲑 *Salmo salar* 的序列一致性最低，为 53.4%。

2.2 *BdorATPG* 基因表达谱分析

以桔小实蝇雌虫前足中的 *BdorATPG* mRNA 含量作为基准含量，对昆虫不同组织中的 mRNA 含量进行分析(图 4)，由图 4 可知 *BdorATPG* mRNA 在

桔小实蝇雌雄虫的不同部位中都有表达，但在触角中的表达量最高。在雌虫中，*BdorATPG* mRNA 在触角中的含量是其前足中的 4.26 倍；雌虫腹节次之，是其前足中的 3.15 倍。*BdorATPG* mRNA 在雌虫生殖节中的表达量最低，是其前足中的 0.32 倍。除触角组织外，*BdorATPG* mRNA 在雄虫的胸和腹节中的表达量相对较高，分别是雌虫前足含量的 3.33和 3.35 倍。在雌雄虫的对应组织中，生殖节中的相对表达量差异较大，其中雄虫生殖节中的表达量是雌虫中的6.04 倍，而在其他组织中，雌雄虫的表达量大致相当。

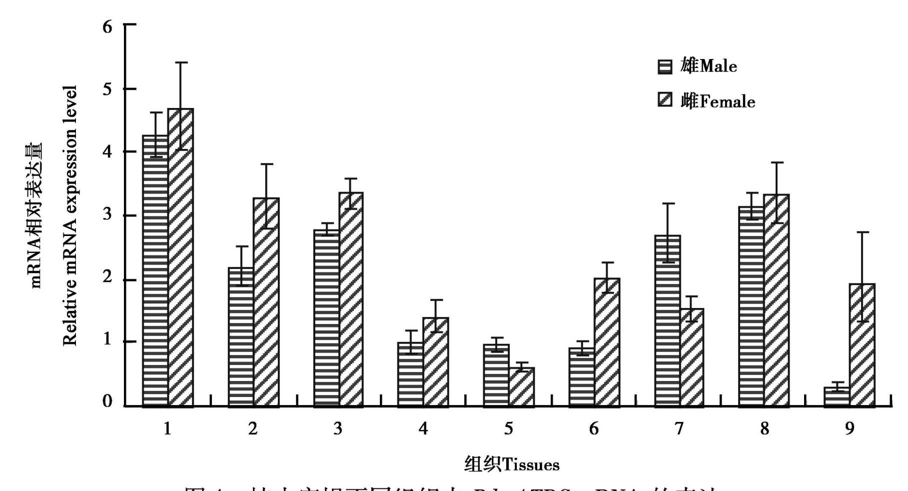


图 4　桔小实蝇不同组织中 *BdorATPG* mRNA 的表达

Fig. 4　Relative expression levels of the *BdorATPG* mRNA in different tissues of *Bactrocera dorsalis*

图中数据为平均值 ± 标准误 Values are mean ± *SE*. 1：触角 Antenna；2：头(去除触角)Head (excluding antenna)；3：胸 Thorax；4：前足 Fore legs；5：中足 Middle legs；6：后足 Hind legs；7：翅 Wings；8：腹节(去除生殖节) Abdominal segments (excluding genital segments)；9：生殖节 Genital segments.

3　讨论

本研究利用 RACE 技术从桔小实蝇中成功克隆获得 V-ATPase G 亚基基因，并命名为 *BdorATPG*。本研究对 26 个物种的 ATPase G 亚基序列同源性比对结果表明，序列的 N 端具有高度保守性，而在 C 端，特别是在第 71 ~ 104 位氨基酸区域的序列表现出较大的遗传变异，推测该区域与其他亚基的作用可能性较小，受到的环境选择压也较小。Rishikesan 等(2009，2010)解析了酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* V-ATPase G 亚基的 N 端(第 1 ~ 59 位氨基酸区域)和 C 端(第 60 ~ 118 位氨基酸区域)核磁共振结构，结果表明 N 端螺旋的一侧呈极性，而在另一侧呈疏水性。本研究中构建的 BdorATPG 亚基模型中亲水性、疏水性残基在螺旋两侧呈对称型分布特征，与上述报道的结构特征一致。

V-ATPase 在生物的各种细胞中发挥重要功能。在昆虫中，研究者发现果蝇 V-ATPase 亚基 B 的缺失能导致幼虫发育异常(Davies *et al*.，1996)。另外，研究表明，表达于果蝇、冈比亚按蚊中肠柱状细胞膜表面的 V-ATPase 通过定向运输 H^+，进而形成中肠中适宜的酸碱性环境(Okech *et al*.，2008；Shanbhag and Tripathi，2009)。本研究发现 *BdorATPG* 在桔小实蝇的腹节中有较高的表达量，但是否在其中肠中有较高的表达有待于进一步的研究。Wanger 等(2004)研究发现，在哺乳动物肾脏、睾丸等生殖有关组织的分泌细胞中存在大量的 V-ATPase，它为精子的生存以及活力的保持提供必须的离子环境。而本研究中发现桔小实蝇雄虫生殖节中的 *BdorATPG*mRNA 含量是雌虫生殖节中的 6.04 倍，推测 V-ATPase 与精子相关的生殖生理过程有密切的关系。在神经信号传导过程中，V-ATPase 与神经递质在突触囊泡中的富集有关(Parsons，2000；Hediger *et al*.，2004)。本研究中发现 *BdorATPG* 在桔小实蝇的触角中表达量最高，这是否与触角中大量的神经信号传导有关还有待于进一步研究。

本研究克隆了桔小实蝇 V-ATPase G 亚基基因，解析了该基因编码蛋白的一级结构特点，构建了该蛋白 N 端序列的三维结构，并对其在不同组织中的表达特征进行了分析，可为揭示 V-ATPaseG 亚基在桔小实蝇中的生理功能提供参考。

参 考 文 献 (References)

Charsky CM, Schumann NJ, Kane PM, 2000. Mutational analysis of subunit G (Vma10p) of the yeast vacuolar H^+-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 275(47): 37232-37239.

Davies SA, Goodwin SF, Kelly DC, Wang Z, Sözen WA, Kaiser K, Dow JA, 1996. Analysis and inactivation of *vha55*, the gene encoding the vacuolar ATPase B-subunit in *Drosophila melanogaster* reveals a larval lethal phenotype. *Journal of Biological Chemistry*, 271(48): 30677-30684.

Dietz KJ, Tavakoli N, Kluge C, Mimura T, Sharma SS, Harris GC, Chardonnens AN, Golldack, D, 2001. Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical levels. *Journal of Experimental Botany*, 52(363): 1969-1980.

Haramoto FH, Bess HA, 1970. Recent studies on the abundance of the oriental and Mediterranean fruit flies and the status of their parasites. *Proceedings of the Hawaiian Entomological Society*, 20(3): 551-556.

Hediger HA, Romero MF, Peng JB, Rolfs A, Takanaga H, Bruford EA, 2004. The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins: Introduction. *Pfluegers Archiv - European Journal of Physiology*, 447(5): 465-468.

Hsu JC, Feng HT, 2000. Insecticide susceptibility of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae) in Taiwan. *Chinese Journal of Entomology*, 20: 109-118. [许如君, 冯海东, 2000. 台湾东方果实蝇 *Bactrocera dorsalis* (Hendel)对杀虫剂的感受性. 中华昆虫, 20: 109-118]

Jones RP, Durose LJ, Findlay JB, Harrison MA, 2005. Defined sites of interaction between subunits E (Vma4p), C (Vma5p), and G (Vma10p) within the stator structure of the vacuolar H^+-ATPase. *Biochemistry*, 44(10): 3933-3941.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25(4): 402-408.

Lv X, Lu YY, Zeng L, Liang GW, 2007. Economic thresholds of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel), in carambola orchards. *Acta Phytophylacica Sinica*, 34: 471-474. [吕欣, 陆永跃, 曾玲, 梁广文, 2007. 杨桃园桔小实蝇的防治指标. 植物保护学报, 34: 471-474]

Okech BA, Boudko DY, Linser PJ, Harvey WR, 2008. Cationic pathway of pH regulation in larvae of *Anopheles gambiae*. *Journal of Experimental Biology*, 211(6): 957-968.

Parsons SM, 2000. Transport mechanisms in acetylcholine and monoamine storage. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 14: 2423-2434.

Rishikesan S, Gayen S, Thaker YR, Vivekanandan S, Manimekalai MS, Yau YH, Shochat SG, Grüber G, 2009. Assembly of subunit d (Vma6p) and G (Vma10p) and the NMR solution structure of subunit G (G_{1-59}) of the *Saccharomyces cerevisiae* V_1V_0 ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1787(4): 242-251.

Rishikesan S, Manimekalai MS, Grüber G, 2010. The NMR solution structure of subunit G (G_{61-101}) of the eukaryotic V_1V_0 ATPase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1798(10): 1961-1968.

Shanbhag S, Tripathi S, 2009. Epithelial ultrastructure and cellular mechanisms of acid and base transport in the *Drosophila* midgut. *Journal of Experimental Biology*, 212(11): 1731-1744.

Stevens TH, Forgac M, 1997. Structure, function and regulation of the vacuolar (H^+)-ATPase. *Annual Review of Cell Developmental Biology*, 13: 779-808.

Wanger CA, Finberg KE, Breton S, Marshansky V, Brown D, Geibel J, 2004. Renal vacuolar H^+-ATPase. *Physiology Reviews*, 84(4): 1263-1314.

Yuan SY, Kong Q, Xiao C, Yang SS, Sun W, Zhang JB, Li ZY, 2006. Introduction to two kinds of artificial diets for mass rearing of adult *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Journal of Huazhong Agricultural University*, 25(4): 371-374. [袁盛勇, 孔琼, 肖春, 杨仕生, 孙文, 张建波, 李正跃, 2006. 桔小实蝇成虫人工饲料的筛选. 华中农业大学学报, 25(4): 371-374]

Zhang YP, Zeng L, Lu YY, Liang GW, 2007. Monitoring of insecticide resistance of *Bactrocera dorsalis* adults in south China. *Journal of South China Agricultural University*, 28(3): 20-23. [章玉苹, 曾玲, 陆永跃, 梁广文, 2007. 华南地区桔小实蝇抗药性动态监测. 华南农业大学学报, 28(3): 20-23]

(责任编辑: 赵利辉)